

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2016

Jasmin Porkka

HSD17 β 1-INHIBIITTOREIDEN SEULONTAMENETELMÄN KEHITYS

Jasmin Porkka

HSD17 β 1-INHIBIITTOREIDEN SEULONTAMENETELMÄN KEHITYS

Entsyymit ovat biomolekyyliä, jotka kiihdyttävät kemiallisia reaktioita. Ne ovat tyypillisesti proteiineja, joilla on uniikki kolmiulotteinen rakenne. Inhibiittorit ovat aineita, joilla entsyymien toiminta voidaan estää. Useat lääkkeet ovat erilaisten entsyymien inhibiittoreita, mistä syystä uusien lääkeaineiden löytäminen ja kehittäminen ovat aktiivisia farmakologian ja biokemian tutkimusalueita.

Hydroksisteroidi (17-beta) dehydrogenaasi tyyppi 1 -entsyymi (HSD17 β 1) osallistuu steroidibiosynteesin vaiheeseen, jossa heikosta estrogeenistä, estronista, muodostuu bioaktiivista estrogeeniä, estradiolia. HSD17 β 1-entsyymi ilmenee useissa estrogeeniriippuvaisissa tautikudoksissa, kuten rintasyöpä- sekä endometrioosikudoksessa, jossa estradiolin tiedetään olevan voimakas kasvutekijä. HSD17 β 1-entsyymin inhibitiota on tutkittu laajalti, ja sen on todettu olevan mahdollinen uusi hoitomuoto estrogeeniriippuvaisille sairauksille.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää seulontamenetelmä HSD17 β 1-entsyymin inhibiittoreille, jolla voidaan tutkia pienmolekyylisten lääkeainekandidaattien kykyä inhiboida HSD17 β 1-entsyymiä. Menetelmän kehityksessä käytettiin hyväksi Forendo Pharmassa aikaisemmin kehitettyjä, sekä julkaisuista etsittyjä seulontamenetelmiä. Uuden HSD17 β 1-entsyymin inhibiittoreiden seulontamenetelmän kehityksessä optimoitiin entsyymin aktiivisuuteen vaikuttavat parametrit; entsyymipitoisuus, rektiopuskurin pH, substraattipitoisuus, kofaktori-pitoisuus sekä inkubointilämpötila.

HSD17 β 1-entsyyminä käytettiin *Escherichia coli* -bakteerissa tuotettua entsyymiä. Testit suoritettiin lääkeaineseulontaan sopivassa 96-kuoppalevyformaattissa. Testeissä estronin konversiota estradioliksi mitattiin Watersin HPLC-laitteella sekä Packardin Radiomatic -leimalaskindetektorilla.

Opinnäytetyön tavoitteet toteutuivat, sillä uuden HSD17 β 1-inhibiittoreiden lääkeaseulontamenetelmän kehitys onnistui. Menetelmän toimivuus varmistettiin tunnetulla HSD17 β 1-inhibiittorilla ja kahdella uudella lääkeainekandidaatilla.

ASIASANAT:

estrogeeni, estradioli, HSD17 β 1, inhibiittori, seulontamenetelmä

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2016 | 37 pages

Instructors:

Jani Pelkonen, Senior Lecturer, Turku University of Applied Sciences
Pasi Koskimies, Project Manager, Forendo Pharma

Jasmin Porkka

DEVELOPMENT OF SCREENING METHOD FOR HSD17 β 1 INHIBITORS

Enzymes are biomolecules that accelerate chemical reactions. Typically, they are proteins with unique three-dimensional structures. Inhibitors are substances that prevent the function of the enzymes. Various drug molecules are inhibitors, which is why the drug discovery and drug development are active research areas in pharmacology and biochemistry.

The hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase type 1 enzyme (HSD17 β 1) takes part in the steroid biosynthesis where weakly active estrogen, estrone, reduces to highly potent estrogen, estradiol. HSD17 β 1 is expressed in various estrogen-dependent disease tissues, such as breast cancer and endometriosis tissues, where estradiol is known to be an intense growth promoter. HSD17 β 1 inhibition is extensively researched and found to be a potential new therapeutic treatment for certain estrogen-dependent diseases.

The objective of the thesis was to develop a screening method for HSD17 β 1 inhibitors, allowing assessment of the effectiveness of a small molecule drug candidate's inhibition of HSD17 β 1. The development of the method was based on previous methods developed in Forendo Pharma and methods found in the literature. In the new screening method, the parameters that affect the enzyme activity, namely enzyme concentration, reaction buffer pH, substrate concentration, cofactor concentration and incubation temperature, were optimized.

The HSD17 β 1 enzyme that was used was produced in *Escherichia coli* bacteria. The tests were performed in 96-well plate format suitable for drug screening. The conversion from estrone to estradiol was analysed with Waters HPLC and a Packard Radiomatic scintillation detector.

The objective of the thesis was met, since a new screening method for HSD17 β 1-inhibitors could be developed. The functionality of the screening method was assessed with one known HSD17 β 1 inhibitor and with two new drug candidates.

KEYWORDS:

estrogen, estradiol, HSD17 β 1, inhibitor, screening method

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	7
2 STEROIDIHORMONIT	8
2.1 Steroidihormonien toiminta	8
2.2 Steroidihormonien biosynteesi	9
3 ENTSYYMIT JA INHIBIITTORIT	11
3.1 Entsyymien toiminta	11
3.2 Entsyymien aktiivisuus	13
3.3 Inhibiittorit	16
3.3.1 Kompetitiiviset inhibiittorit	16
3.3.2 Nonkompetitiiviset inhibiittorit	17
3.3.3 Unkompetitiiviset inhibiittorit	19
3.3.4 Inhibiittoreiden IC ₅₀ määrittäminen	20
4 HSD17B-ENTSYYMIT	21
4.1 HSD17β1	21
4.2 HSD17β1 lääkekehityksen kohteena	21
5 MENETELMÄT	23
5.1 Analyysilaitteisto	23
5.2 Entsyymien aktiivisuusmittauksen optimointi	24
5.3 Entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus	25
6 TULOKSET	26
6.1 Proteiinipitoisuus	26
6.2 Substraatti- ja kofaktoripitoisuus	28
6.3 Puskuriliuoksen pH	29
6.4 Uusi seulontamenetelmä	30
6.5 Entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus	30
7 POHDINTA	34
LÄHTEET	36

LIITTEET

- Liite 1. Käytettyjen reagenssien tiedot
Liite 2. HSD17 β 1 proteiinin sertifikaatti

KAAVAT

Kaava 1. Entsyyattisen reaktion reaktioyhtälö.	12
Kaava 2. Michaelis-Menten -yhtälö.	14
Kaava 3. Lineweaver-Burk yhtälö.	14
Kaava 4. IC ₅₀ -arvon laskeminen.	20
Kaava 5. Inhibitioprosentin laskeminen.	31

KUVAT

Kuva 1. Steroidihormonien biosynteesi.	9
Kuva 2. Kompetitiivisen inhibiittorin kiinnittyminen entsyymiin ja EI-kompleksin muodostuminen.	16
Kuva 3. Nonkompetitiivisen inhibiittorin kiinnittyminen substraattiin ja ESI-kompleksin muodostuminen.	18
Kuva 4. Unkompetitiivisen inhibiittorin sitoutuminen entsyymiin.	19
Kuva 5. Estronin pelkistyminen estradioliksi.	21

KUVIOT

Kuvio 1. Aktivointienergian muutos reaktiossa.	12
Kuvio 2. Substraattikonsentraatio [S] vs. reaktionopeus (v).	13
Kuvio 3. Lineweaver-Burk kuvaaja.	15
Kuvio 4. Kompetitiivisen inhibiittorin vaikutus K _M ja V _{max} -arvoihin.	17
Kuvio 5. Nonkompetitiivisen inhibiittorin vaikutus K _M ja V _{max} -arvoihin.	18
Kuvio 6. Unkompetitiivisen inhibiittorin vaikutus K _M ja V _{max} -arvoihin.	19
Kuvio 7. Konversio vs. proteiinipitoisuus.	27
Kuvio 8. Konversio vs. substraattipitoisuus.	29
Kuvio 9. Konversio vs. puskuriliuoksen pH.	30
Kuvio 10. Ensimmäisen IC ₅₀ -määrityksen kuvaaja.	32
Kuvio 11. Toisen IC ₅₀ -määrityksen tulosten kuvaaja.	33

TAULUKOT

Taulukko 1. Entsyymien aktiivisuusmittauksen tulokset.	26
Taulukko 2. Proteiinipitoisuuden optimoinnin tulokset.	27
Taulukko 3. Substraatti- ja kofaktoripitoisuuden optimoinnin tulokset.	28
Taulukko 4. Puskuriliuoksen pH-arvon optimointi.	29
Taulukko 5. Inhibiittoritestin tulokset.	31
Taulukko 6. Testi-inhibiittoreiden IC ₅₀ -arvot.	33

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Affiniteetti	Aineiden taipumus yhdistyä kemiallisen reaktion avulla
AKR	Aldo-keto reduktaasi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EI-kompleksi	Entsyymi-inhibiittorikompleksi
ES-kompleksi	Entsyymi-substraattikompleksi
ESI-kompleksi	Entsyymi-substraatti-inhibiittorikompleksi
HSD	Hydroksisteroidi dehydrogenaasi
Hydrogenaasi	Entsyymi, joka katalysoi hydroksyyliyhdykkeen muodostumista
Kemopreventio	Syövän ehkäiseminen lääkkeillä
Lyaasi	Entsyymi, joka katkaisee kovalenttisia sidoksia ja liittää katkaisukohtaan molekyyliryhmän
NADPH	Nikotiiniamidiadeniininukleotidifosfaatti
Ortologit	Eri lajien geenit, jotka ovat peräisin samasta kanta-isästä
Reduktaasi	Pelkistävä entsyymi
TCA	Trikloorietikkahappo

1 JOHDANTO

On arvioitu, että suomalaisista joka kolmas sairastuu syöpään jossakin elämänsä vaiheessa. Hormoniriippuvaiset syövät ovat pahanlaatuisia kasvaimia, jotka ovat syntyneet hormonisäätelyn alaisiin kudoksiin. Rintasyöpä on naisten yleisin syöpäsairaus Suomessa, jota noin joka kymmenes nainen sairastaa jossakin elämänsä vaiheessa. Endometrioosi on krooninen sairaus, jota esiintyy noin 5-10 %:lla hedelmällisessä iässä olevista naisista. Näiden hormoniriippuvaisten sairauksien nykyiset lääkehoidot ovat usein riittämättömiä lääkkeen tehottomuuden tai liiallisten sivuvaikutusten takia.^{1 2 3}

Hydroksisteroidi (17-beta) dehydrogenaasit (HSD17 β) ovat oksidoreduktaaseja, joilla on tärkeä rooli sekä estrogeeni- että androgeenimetaboliassa. Kyseiset entsyymit katalysoivat steroidibiosynteesin viimeisiä vaiheita. Aktiivisten estrogeenien ja androgeenien rooli hormoniriippuvaisten sairauksien kehityksessä on hyvin tunnettu. Koska HSD17 β -entsyymeillä on keskeinen rooli steroidihormonien tuotannossa, ja ne ovat hyvin substrattspezifisiä, voidaan todeta näiden entsyymien olevan lupaavia terapeuttisia kohteita eri hormoniriippuvaisille sairauksille, kuten rintasyövälle, endometrioosille sekä eturauhassyövälle. HSD17 β -entsyymien selektiivinen inhibitio voisi olla tehokas ja hyvin siedetty vaihtoehto nykyisille hormonaalisille hoitomuodoille.⁴

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää HSD17 β 1-entsyymin inhibiittoreiden seulontamenetelmä, käyttäen *Escherichia coli* bakteerissa tuotettua HSD17 β 1-entsyymiä. Kyseinen entsyymi on vastuussa steroidimetabolian vaiheesta, jossa heikosta estrogeenistä, estronista, muodostuu bioaktiivista estrogeeniä eli estradiolia. Estradiolin tiedetään olevan voimakas kasvutekijä useissa hormoniriippuvaisten sairauksien kehityksessä. Tässä opinnäytetyössä kehitetyllä seulontamenetelmällä voidaan määrittää erilaisten pienmolekyylisten yhdisteiden kykyä inhiboida HSD17 β 1-entsyymiä ja seuloa näistä pienmolekyyllisistä lääkeaine-ehdokkaista tehokkaimmat. Opinnäytetyö tehtiin Forendo Pharmalle, jossa kehitetään HSD17 β 1-inhibiittoreita.

Opinnäytetyössä on esitetty kokeellisen osuuden menetelmät ja tulokset, sekä kokeellisen osuuden perustana olevaa teoriaa. Teoriaosuus alkaa steroidihormonien toiminnan ja niiden biosynteesin kuvauksella. Seuraavaksi käsitellään yleisesti entsyymien ja inhibiittoreiden toimintaa, jonka jälkeen keskitytään HSD17 β -entsyymeihin ja erityisesti HSD17 β 1-entsyymiin lääkekehityksen kohteena. Lopuksi on pohdittu kokeellisen osuuden tuloksia ja niihin vaikuttavia tekijöitä.

2 STEROIDIHORMONIT

Luonnollisilla sukupuolihormoneilla, eli androgeeneilla, estrogeeneilla ja keltarauhashormoneilla, on monia biologisia vaikutuksia elimistössä. Nämä hormonit tuotetaan ensisijaisesti sukurauhasissa, sekä jonkin verran lisämunuaisissa ja muissa kudoksissa. Steroidihormonit ovat polaarittomia ja hydrofobisia, joten ne voivat helposti kulkeutua solukalvon läpi. Tästä syystä ne pystyvät myös vuorovaikuttamaan spesifisten solunsisäisten reseptoriensa kanssa joko kohdesolun sytosolissa tai tumassa. Biologisten vaikutuksensa lisäksi steroidihormonit voivat edistää myös hormoniriippuvaisten syöpien ja muiden tautikudosten kasvua.⁵

2.1 Steroidihormonien toiminta

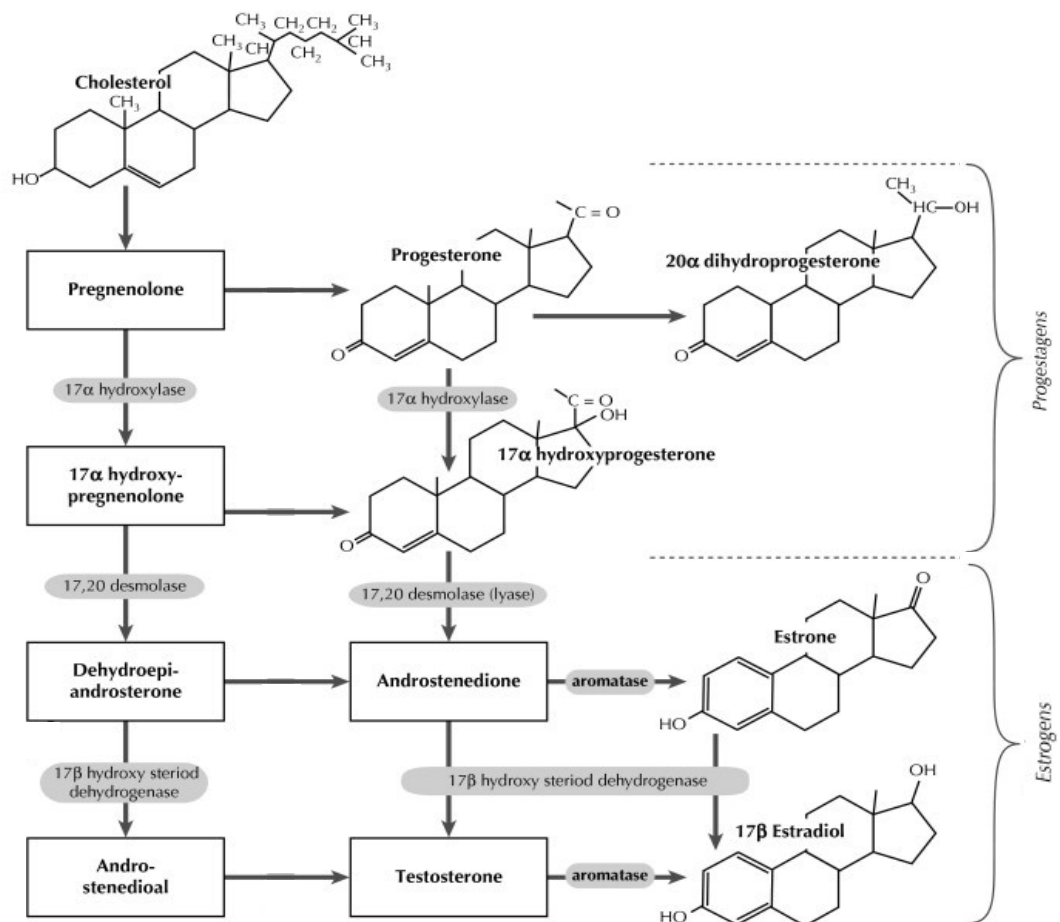
Estrogeenit ovat primaarisia naissukupuolihormoneita. Kolme yleisintä estrogeeniä ovat estroni (E1), estradioli (E2) ja estrioli (E3). Näistä kolmesta estradioli on aktiivisin, ja se on ensisijaisesti vastuussa naisten sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehityksestä. Estrogeeneillä ei ole ainoastaan tärkeä rooli sukupuoliominaisuuksien kehityksessä tai lisääntymisessä, vaan ne ovat mukana myös useissa muiden kehon toimintojen kehityksessä ja säätelyssä. Estrogeenit muun muassa toimivat yhdessä kalsiumin, D-vitamiinin sekä muiden hormonien ja mineraalien kanssa luiden kasvun kehityksessä. Estrogeenit vaikuttavat myös aivoihin, maksaan, sydämeen sekä muihin kudoksiin.^{6 7}

Estrogeenit ovat lähtöisin sekä endogeenisistä että eksogeenisistä lähteistä. Endogeenisenä lähteenä toimivat naisten munasarjat, joissa estrogeenejä muodostuu kuukautiskierron aikana. Munasarjojen lisäksi estrogeenejä tuotetaan pienempiä määriä lisämunuaisissa ja myös paikallisesti toissijaisissa kudoksissa, esimerkiksi rasvakudoksessa ja raskauden aikana istukassa.⁶

Miehillä bioaktiivisia androgeeneja ovat testosteroni sekä dihydrotestosteroni (DHT). Androgeeneilla on keskeinen rooli sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehityksessä. Androgeenien tuotanto miehillä tapahtuu kiveksissä ja naisilla munasarjoissa. Androgeenit toimivat myös prekursoreina estrogeenien synteesissä.⁸

2.2 Steroidihormonien biosynteesi

Steroidihormonien biosynteesi alkaa kolesterolista, kuten kuvassa 1 on esitetty. Kolesterolin on yleisimmin esiintyvä steroidi, joka on läsnä käytännössä kaikissa elävissä organismeissa. Biosynteesin alkuvaiheissa kolesterolista muodostuu pregnenolonia, josta edelleen muodostuu progesteronia. Näistä lähtöaineista muodostuu estrogeenibiosynteesin kannalta tärkeitä tuotteita, kuten dehydroepiandrosteronia (DHEA) ja androstenedionia.⁹



Kuva 1. Steroidihormonien biosynteesi.¹⁰

Estrogeenibiosynteesin seuraavissa vaiheissa DHEA:sta muodostuu androstenediolia sekä androstenedionia. Androstenedionista muodostuu edelleen aromataasilla estronia. Steroidihormonien biosynteesissä tärkeässä roolissa ovat myös HSD17 β -entsyymit. Bioaktiivinen estradioli voi muodostua joko estronista HSD17 β tyyppi 1 -entsyymien pelkistämällä, tai aromataasilla testosteronista. Testosteroni taas muodostuu HSD17 β tyyppien

3 tai 5 katalysoimana androstenedionista tai androstenediolista. HSD17 β tyyppi 2 taas katalysoi HSD17tyypin 1 vastakkaista reaktiota, jossa estradioli hapettuu estroniksi. ⁹

3 ENTSYYMIT JA INHIBIITTORIT

Entsyymit ovat biomolekyyliä, jotka katalysoivat eli kiihdyttävät kemiallisia reaktioita. Melkein kaikki soluissa tapahtuvat reaktiot tarvitsevat entsyymejä tapahtuakseen elämän ylläpitoon tarvittavalla nopeudella. Vaikka entsyymikatalyysit ovat edellytys elämälle, kontrolloimaton entsyymiaktiivisuus voi johtaa myös sairauksiin. Suuri osa esimerkiksi viruslääkkeistä ja antibiooteista toimii valikoivan entsyymi-inhibition kautta. ^{11 12}

Kaikki entsyymit ovat proteiineja, lukuun ottamatta pientä ryhmää katalyyttisiä RNA-entsyymejä, ribotsyymejä. Kuten kaikki proteiinit, entsyymit muodostuvat pitkistä lineaarisista aminohappoketjuista, jotka laskostuvat muodostaen kolmiulotteisen rakenteen. Entsyymien aktiivisuus määräytyy tämän kolmiulotteisen rakenteen mukaan. Entsyymit voidaan denaturoida kuten proteiinitkin, jolloin niiden biologinen aktiivisuus häviää. ^{11 13}

Entsyymien proteiini-osaa kutsutaan apoentsyymiksi. Useat entsyymit tarvitsevat toimiakseen myös proteiinittoman komponentin, kofaktorin. Suurin osa kofaktoreista on epäorgaanisia ioneja, kuten Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ja Zn^{2+} , tai orgaanisia molekyylejä eli koentsyymejä. Jotkut entsyymit vaativat sekä koentsyymien, että yhden tai useamman metalli-ionin toimiakseen. Toimivaa, katalyyttisesti aktiivista entsyymiä yhdessä sen koentsyymien ja/tai kofaktorin kanssa kutsutaan holoentsyymiksi. ¹¹

3.1 Entsyymien toiminta

Entsyaattisissa reaktioissa prosessin alussa olevia molekyylejä kutsutaan substraateiksi. Entsyymien katalysoidessa reaktiota muuttuvat substraatit toisenlaisiksi molekyyleiksi eli tuotteiksi. Useimmat entsyymit ovat kooltaan huomattavasti suurempia kuin niiden substraatit. Tällöin vain pieni osa entsyymistä on varsinaisesti mukana reaktiossa. Entsyymien kohtaa, johon substraatti kiinnittyy, kutsutaan sen aktiiviseksi kohdaksi. ¹¹

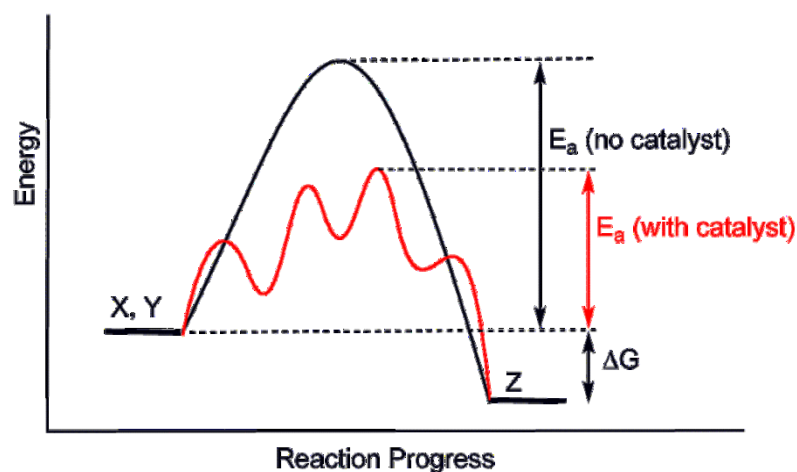
Entsyymien katalysoimat reaktiot alkavat entsyymi-substraattikompleksin muodostumisella, missä substraatti kiinnittyy entsyymien aktiiviseen kohtaan. Kun kompleksi on muodostunut, entsyymien aktiivisen kohdan kemiallisesti reaktiiviset komponentit muuntavat substraatin tuotteeksi. Tämä prosessi tapahtuu yleensä useamman välivaiheen kautta. Tuotteen muodostumisen jälkeen tuote irtautuu entsyymistä, jolloin entsyymi vapautuu

jälleen seuraavan reaktion käyttöön. Entsyymien katalysoimia reaktioita voidaan yksinkertaisesti kuvata kaavan 1 mukaisella reaktioyhtälöllä. Kaavassa entsyymi (E) ja substraatti (S) ovat alkutuotteita, jotka muodostavat entsyymi-substraattikompleksin (ES). Tästä kompleksista muodostuu tuote (P). Reaktion jälkeen entsyymi palaa taas vapaaksi entsyymiksi, ja on uudelleen käytettävissä seuraavaan reaktioon.^{12 13 14}



Kaava 1. Entsyymaattisen reaktion reaktioyhtälö.¹⁴

Kuten kaikki katalyytit, entsyymit toimivat alentamalla reaktion energiakynnystä eli aktivointienergiaa, joka vaaditaan reaktion etenemiseen. Suurin energiakynnys reaktioissa on siirtymätilan muodostumisessa. Siirtymätila on lähtöaineiden ja tuotteiden välimuoto, mistä reaktio voi edetä joko kohti tuotteita, tai hajota takaisin lähtöaineiksi. Entsyymien katalysoimissa reaktioissa aktivointienergian alentaminen saavutetaan ES-kompleksin muodostuksella. Kuviossa 1 on havainnollistettu aktivointienergian (E_a) muutos katalyytin vaikuttaessa reaktiossa. Kuviossa ΔG kuvaa Gibbsin vapaan energian kokonaismäärän muutosta. Aktivointienergian alentaminen kiihdyttää huomattavasti reaktion nopeutta, useat entsyymien katalysoimat reaktiot ovat tuhansia kertoja nopeampia kuin katalysoimattomat reaktiot. Entsyymit kokevat fysikaalisia muutoksia reaktion aikana, mutta palautuvat aina alkuperäiseen muotoonsa reaktion päätyttyä, eivätkä ne muiden katalyyttien tapaan kulu reaktiossa.^{11 13}

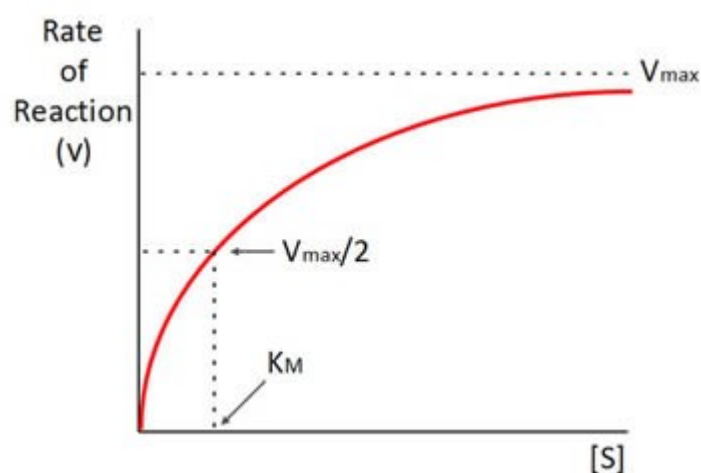


Kuvio 1. Aktivointienergian muutos reaktiossa.¹⁵

Entsyymit eroavat muista kemiallisista katalyyteistä olemalla erittäin spesifisiä. Entsyymit toimivat usein vain yhden substraatin tai samankaltaisen rakenteen omaavan substraattiryhmän kanssa. Entsyymien ja substraattien muoto, hydrofiilinen tai hydrofobinen ominaisuus sekä niiden varaus vaikuttavat tähän spesifisyyteen. Entsyymien spesifisyys voidaan jakaa neljään erilaiseen spesifisyyteen. Entsyymin ollessa absoluuttisesti spesifinen, entsyymi katalysoi vain yhtä reaktiota. Ryhmäspesifinen entsyymi toimii vain molekyyleillä, joissa on tietynlaisia funktionaalisia ryhmiä, kuten amino-, fosfaatti- ja metyyli-ryhmiä. Sidosspesifinen entsyymi vaikuttaa vain tietyntyypiseen kemialliseen sidokseen huolimatta siitä millainen molekyylin muu rakenne on. Stereokemiallisesti spesifinen entsyymi vaikuttaa tietynlaiseen stereoisomeeriin tai optiseen isomeeriin.^{13 16}

3.2 Entsyymien aktiivisuus

Entsyymin katalysoiman reaktion reaktionopeus on suoraan verrannollinen entsyymin konsentraatioon, jos ylimäärä vapaita substraattimolekyylejä on saatavilla. Jos entsyymimäärä pysyy vakiona, substraattikonsentraation asteittainen lisääminen johtaa reaktionopeuden nousuun, kunnes reaktionopeus saavuttaa maksimiarvon (V_{\max}). Reaktionopeuden ollessa maksimiarvossa oletetaan kaikkien entsyymien aktiivisten kohtien olevan täytetty substraateilla, eikä substraattikonsentraation kasvattaminen silloin enää vaikuta reaktion nopeuteen (v). Kuviossa 2 on esitetty kuvaaja substraattikonsentraation lisäämisen vaikutuksesta reaktion nopeuteen.¹⁶



Kuvio 2. Substraattikonsentraatio [S] vs. reaktionopeus (v).¹⁷

Kuvio 2 noudattaa Michaelis-Menten kinetiikkaa, jolla kuvataan entsyymaattisesti katalysoitujen reaktioiden nopeutta ja siihen vaikuttavia tekijöitä. Michaelis-Menten -yhtälö (kaava 2) kuvaa katalysoidun reaktion reaktionopeuden riippuvuutta substraattikonsentraatiosta. Kaavassa v kuvaa reaktionopeutta, V_{\max} reaktion maksiminopeutta, $[S]$ substraattikonsentraatiota ja K_m Michaelis-vakiota. ¹⁴

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Kaava 2. Michaelis-Menten -yhtälö. ¹⁴

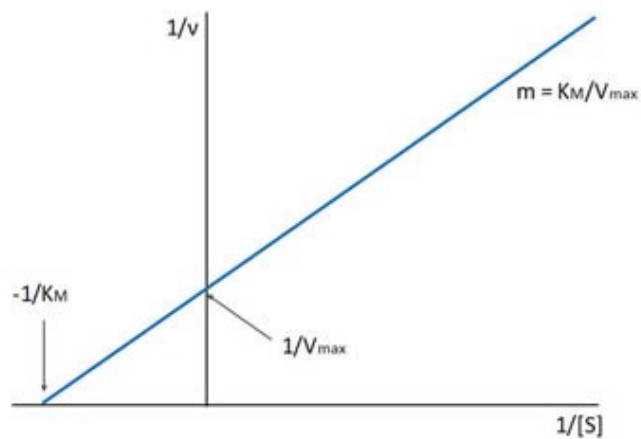
Michaelis-Menten kinetiikassa käytetään Michaelis-vakiota K_M , joka on substraattikonsentraatio kohdassa, jossa reaktionopeus on tasan puolet reaktion maksiminopeudesta (kuvio 2). Michaelis-vakio antaa tietoa substraatin taipumuksesta sitoutua entsyymiin. Mitä pienempi K_M -arvo, sitä suurempi on entsyymin affiniteetti substraattia kohtaan, ja näin ollen sitä nopeampi reaktio on. Suuri K_M -arvo taas osoittaa suuremman substraattikonsentraation tarpeen reaktion maksiminopeuden saavuttamiselle. ¹⁶

Aiemmin esitetystä kuvaajasta, substraattikonsentraatio vs. reaktionopeus (kuvio 2) pysytään ainoastaan arvioimaan V_{\max} -arvo. Michaelis-Menten -yhtälössä esiintyvien K_M ja V_{\max} -arvojen määrittämiselle on luotu toinen kuvaaja, lineaarinen Lineweaver-Burk kuvaaja. Kuvaaja on määritetty Michaelis-Menten -yhtälön (kaava 2) avulla, ottamalla käänteisluvut yhtälön molemmilta puolilta. Lopullinen kuvaajan muodostava yhtälö on esitetty kaavassa 3. ¹⁴

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Kaava 3. Lineweaver-Burk yhtälö. ¹⁴

Lineweaver-Burk kuvaajassa (kuvio 3) esitetään substraattikonsentraation käänteisluku reaktionopeuden käänteisluvun funktiona. Kuvaajan noudattaessa Michaelis-Menten kinetiikkaa syntyy lineaarinen suora, jonka x- ja y-akselien leikkauspisteistä voidaan määrittää käänteisarvot K_M ja V_{\max} . Lineweaver-Burk kuvaajaa voidaan käyttää myös entsyymien inhibiittoreiden tutkimisessa. ¹⁶



Kuvio 3. Lineweaver-Burk kuvaaja. ¹⁷

Entsyymi- ja substraattikonsentraatioiden vaikutuksen lisäksi entsyymien aktiivisuus on usein riippuvainen pH:sta. Entsyymeillä on optimi pH, jossa ne osoittavat maksimaalista aktiivisuutta. Tämä pH-arvo on yleensä sama kuin sen olosuhteen pH, missä entsyymi luonnossa toimii. Useimmilla entsyymeillä on korkein aktiivisuus pH 6 ja pH 8 välillä. Entsyymit toimivat elävässä systeemissä melkein vakiossa pH:ssa, koska ne ovat ympäristössä, joka sisältää puskureita. ¹³

Entsyymien pH-riippuvaisuus on useiden eri tapahtumien aikaansaannosta. Ionisoituvat ryhmät entsyymien aktiivisessa kohdassa, substraatissa tai entsyymi-substraattikompleksissa voivat vaikuttaa katalyysiin riippuen siitä, ovatko reaktiivisten ryhmien protonit dissosioituneita vai eivät. Näiden ryhmien ionisaatio riippuu niiden pK-arvosta, ympäröivien ryhmien kemiallisista ominaisuuksista sekä reaktiomediumin pH:sta. Muutokset pH-arvossa vaikuttavat substraatin kiinnittymiseen aktiiviseen kohtaan, sekä entsyymi-substraattikompleksin hajoamisnopeuteen. ¹⁴

Melkein kaikkien kemiallisten reaktioiden nopeus kasvaa lämpötilan noustessa. Lämpötilan nousu aiheuttaa molekyylien keskimääräisen kineettisen energian ja nopeuden kasvun, mikä johtaa suurempaan todennäköisyyteen molekyylien törmäykselle. Entsyymit eivät kuitenkaan kestä korkeita lämpötila, sillä ne denaturoituvat ja menettävät aktiivisuutensa. Denaturointilämpötilan alapuolella reaktionopeus kuitenkin keskimäärin tuplaantuu lämpötilan noustessa 10 °C. Entsyymien optimilämpötila on usein lähellä sitä organismin lämpötilaa, jossa katalyysi tapahtuu. Ihmisillä useiden entsyymien optimilämpötila on 37 °C. ¹⁴

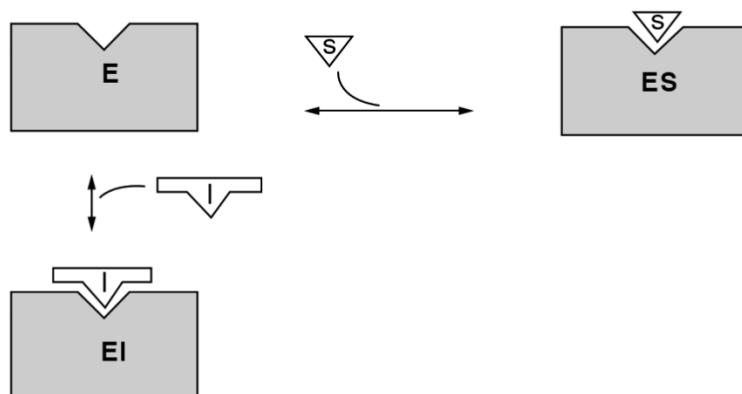
3.3 Inhibiittorit

Inhibiittorit ovat molekyylejä, jotka pienentävät entsyymien katalyyttistä aktiivisuutta. Entsyymi-inhibitio on yksi keino, jolla entsyymien aktiivisuutta säädellään kokeellisesti tai luonnollisesti. Useimmat terapeutiset lääkkeet toimivat inhiboimalla spesifistä entsyymiä.⁴

Inhibiittorit jaetaan reversiibleihin ja irreversiibleihin inhibiittoreihin. Irreversiibelit inhibiittorit sitoutuvat entsyymeihin kovalenttisin sidoksin ja niin tiukasti, ettei niitä voida fyysisillä erotuskeinoilla erottaa. Reversiibelit inhibiittorit sitoutuvat entsyymiin vain heikosti, jolloin inhibitio voidaan estää poistamalla inhibiittori entsyymistä, ja näin palauttamalla entsyymin toiminta ennalleen. Reversiibelit inhibiittorit jaetaan kolmeen eri ryhmään, kompetitiivisiin, nonkompetitiivisiin ja unkompetitiivisiin inhibiittoreihin.¹¹

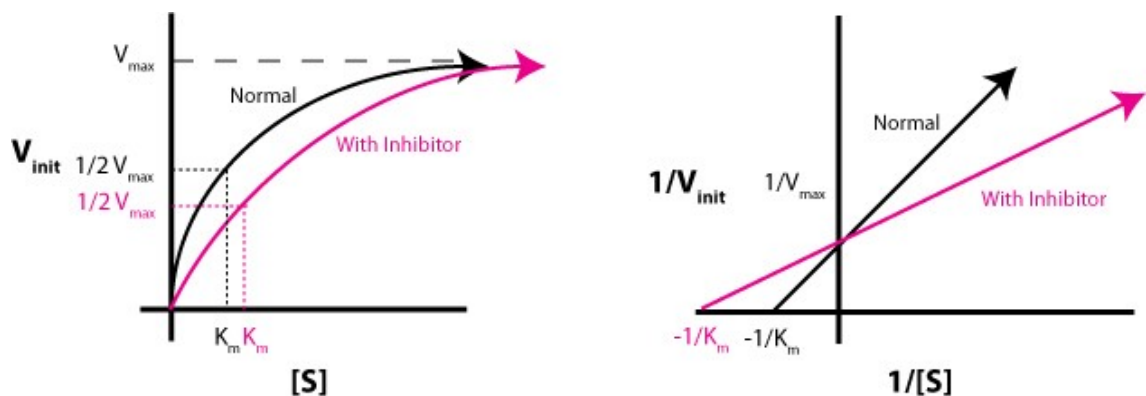
3.3.1 Kompetitiiviset inhibiittorit

Kompetitiiviset inhibiittorit kilpailevat substraatin kanssa kiinnittymisestä entsyymin aktiiviseen kohtaan. Kompetitiivinen inhibiittori on rakenteeltaan hyvin samankaltainen kuin substraatti. Kiinnittyessään entsyymiin kuvan 2 mukaisesti, se muodostaa entsyymin kanssa entsyymi-inhibiittorikompleksin (EI) ja näin ollen estää substraatin kiinnittymisen sekä ES-kompleksin muodostumisen. Kompetitiivisen inhibiittorin toiminta voidaan kumota substraattikonsentraatiota lisäämällä.¹³



Kuva 2. Kompetitiivisen inhibiittorin kiinnittyminen entsyymiin ja EI-kompleksin muodostuminen.¹²

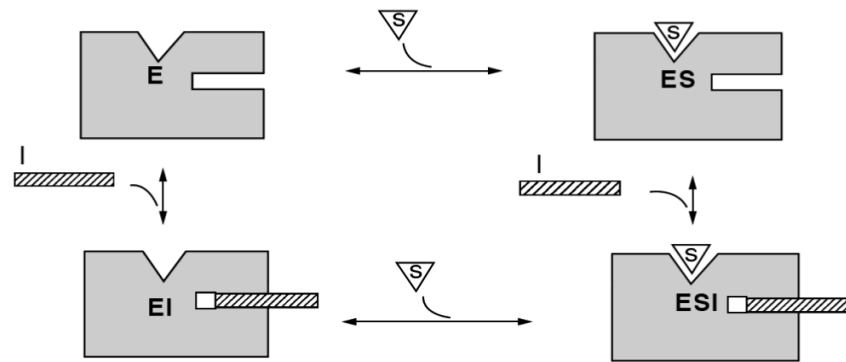
Lineweaver Burk ja Michaelis-Menten kuvaajien avulla kuvion 4 mukaisesti voidaan esittää, kuinka kompetitiivinen inhibiittori muuttaa K_M ja V_{max} -arvoja verrattuna reaktioon, jossa inhibiittoria ei ole. Kompetitiiviset inhibiittorit vaikuttavat K_M -arvoon, mutta ei entsyymin katalysoiman reaktion nopeuteen. K_M -arvo kasvaa, sillä suurempi substraattikonsentraatio tarvitaan inhibiittorin syrjäyttämiseen ja entsyymin aktiivisten kohtien maksimaaliseen täyttöön. Inhibiittori ei vaikuta reaktion maksiminopeuteen, sillä se ei muokkaa entsyymin rakennetta, milloin toimivia entsyymin aktiivisia kohtia on edelleen yhtä paljon.¹⁶



Kuvio 4. Kompetitiivisen inhibiittorin vaikutus K_M ja V_{max} -arvoihin.¹⁸

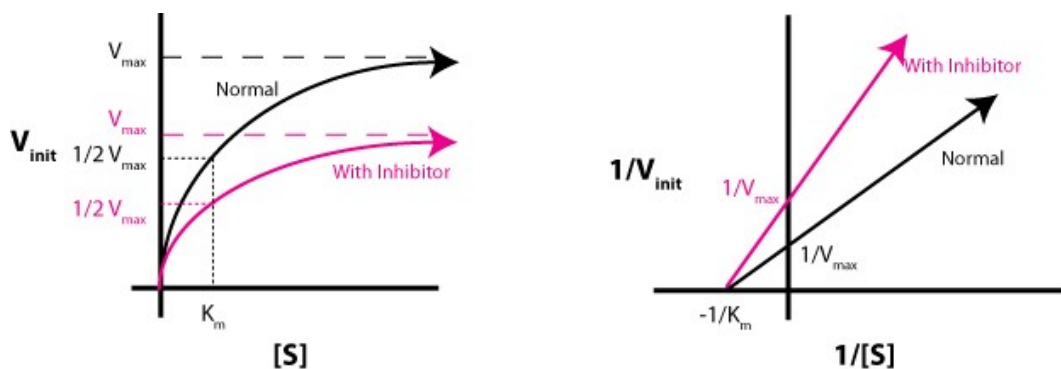
3.3.2 Nonkompetitiiviset inhibiittorit

Nonkompetitiivinen inhibiittori ei yleensä muistuta rakenteeltaan ollenkaan substraattia, joten niiden välillä ei ole kilpailua substraatin kiinnittymiskohdasta. Nonkompetitiivinen inhibiittori kiinnittyy kuvan 3 mukaisesti entsyymin allosteeriseen kohtaan jättäen vapaaksi aktiivisen kohdan substraatin kiinnittymiselle. Allosteerinen kohta on entsyymin kohta, joka on jokin muu kuin entsyymin aktiivinen kohta. Inhibiittorin sekä substraatin kiinnittyessä entsyymiin muodostuu entsyymi-substraatti-inhibiittorikompleksi (ESI), joka tekee entsyymistä inaktiivisen. Koska inhibiittorin ja substraatin välillä ei ole kilpailua, kompetitiivisesta inhibiittorista poiketen ei substraattikonsentraation lisäys auta kumoamaan inhibiittorin vaikutusta.^{11 14}



Kuva 3. Nonkompetitiivisen inhibiittorin kiinnittyminen substraattiin ja ESI-kompleksin muodostuminen. ¹²

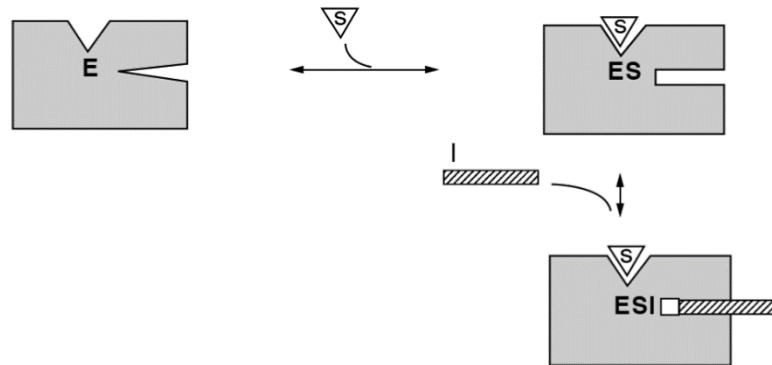
Nonkompetitiivisen inhibiittorin kiinnittyminen entsyymiin muokkaa entsyymin rakennetta sekä toimintaa. Substraatti pystyy edelleen kiinnittymään entsyymiin aktiiviseen kohtaan, mutta muutokset entsyymiin kolmiulotteisessa rakenteessa johtavat siihen, ettei siirtymätilan stabilisointi ja reaktion katalysointi enää onnistu. Kuviosta 5 nähdään kuinka inhibiittori aiheuttaa V_{\max} -arvon alenemisen, sillä tuotteita ei muodostu enää niin suurella nopeudella. K_M -arvo pysyy samana, koska inhibiittori ei vaikuta substraatin kykyyn sitoutua entsyymiin. ¹¹



Kuvio 5. Nonkompetitiivisen inhibiittorin vaikutus K_M ja V_{\max} -arvoihin. ¹⁸

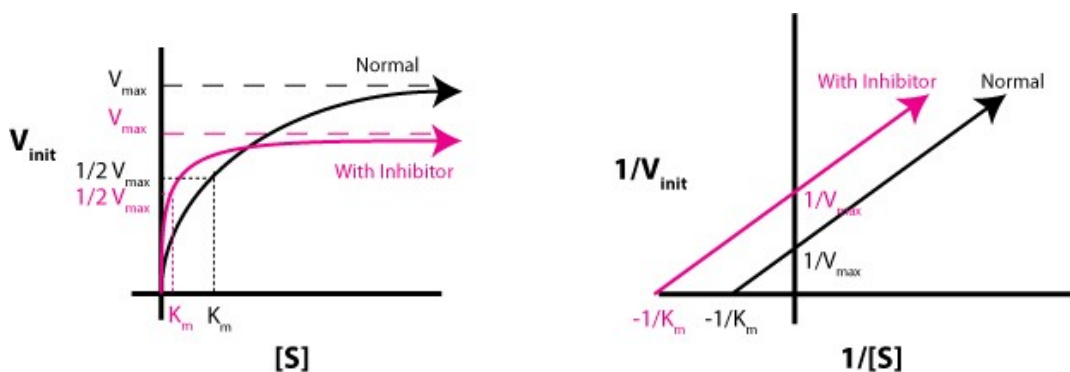
3.3.3 Unkompetitiiviset inhibiittorit

Unkompetitiivinen inhibiittori voi sitoutua entsyymiin allosteeriseen kohtaan vasta ES-kompleksin muodostumisen jälkeen kuvan 4 mukaisesti. Substraatin liittyminen entsyymiin aktiiviseen kohtaan muokkaa entsyymiä niin, että entsyymiin allosteerisesta kohdasta tulee inhibiittorille sopiva.¹¹



Kuva 4. Unkompetitiivisen inhibiittorin sitoutuminen entsyymiin.¹²

Inhibiittorin sitoutumisen seurauksena syntyy ESI-kompleksi, jolloin entsyymi menettää aktiivisuutensa, eikä entsyymi pysty katalysoimaan tuotteiden muodostumista substraatista. Kuviossa 6 havaitaan kuinka inhibiittori vaikuttaa arvoihin verrattuna reaktioon, jossa inhibiittoria ei ole. Unkompetitiivisen inhibiittorin sitoutuessa ainoastaan jo muodostuneeseen ES-kompleksiin, inhibiittori pienentää sekä V_{\max} että K_M -arvoa saman verran.¹⁴



Kuvio 6. Unkompetitiivisen inhibiittorin vaikutus K_M ja V_{\max} -arvoihin.¹⁸

Unkompetitiivinen inhibitio toimii parhaiten substraattikonsentraation ollessa suuri. Unkompetitiivinen inhibiittori on inhibiittoreista harvinaisin.¹⁴

3.3.4 Inhibiittoreiden IC₅₀ määrittäminen

Inhibiittoreiden tehoa voidaan kuvata niiden IC₅₀-arvolla. IC₅₀-arvo kertoo sen inhibiittorikonsentraation, joka tarvitaan inhiboimaan 50 % entsyymin toiminnasta. Farmaseuttisessa tutkimuksessa IC₅₀ on yleisesti käytetty yksikkö kuvaamaan lääkeaineiden *in vitro* aktiivisuutta.¹⁹ IC₅₀-arvo lasketaan kaavan 4 mukaisesti.

$$IC_{50} = \frac{50\% - Low_{inh\%}}{High_{inh\%} - Low_{inh\%}} \cdot (High_{conc} - Low_{conc}) + Low_{conc}$$

Kaava 4. IC₅₀-arvon laskeminen.¹⁹

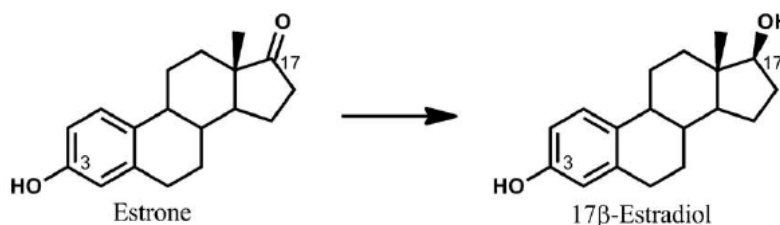
Kaavassa $Low_{inh\%} / High_{inh\%}$ kuvaa inhibitioprosenttia suoraan 50 % inhibition alapuolella ja yläpuolella. $Low_{conc} / High_{conc}$ kuvaavat edellä mainittujen inhibitioprosenttien vastaavia testiaineiden konsentraatioita.

4 HSD17 β -ENTSYYMIT

HSD17 β -entsyymit ovat NADPH/NAD⁺ riippuvaisia oksidoreduktaaseja, jotka joko pelkistävät 17-ketosteroideja tai hapettavat 17 β -hydroksisteroideja, ja näin ollen säätelevät aktiivisten androgeenien ja estrogeenien määrää kohdekudoksessa. HSD17 β -entsyymit, lukuun ottamatta tyyppiä 5 (HSD17 β 5), kuuluvat lyhytketjuisten dehydrogenaasien/reduktaasien (SDR) superperheeseen. Tyyppi 5 kuuluu aldo-keto reduktaasien (AKR) superperheeseen. Nisäkkäiden HSD17 β -entsyymiperheeseen kuuluu 14 entsyymiä, joista 12 ortologia esiintyy ihmisillä.^{20 21}

4.1 HSD17 β 1

HSD17 β 1 katalysoi ensisijaisesti aktiivisen estradiolin muodostumista inaktiivisesta estronista. Kuvassa 5 HSD17 β 1 -entsyymi pelkistää estronin 17 hiilen ketonin alkoholiksi muodostaen estradiolia. Ihmisillä HSD17 β 1-entsyymiä esiintyy erityisesti kudoksissa, jotka ovat estradiolin kohdekudoksia, kuten munasarjoissa, istukassa ja rintakudoksessa.^{22 21}



Kuva 5. Estronin pelkistyminen estradioliksi.²⁰

4.2 HSD17 β 1 lääkekehityksen kohteena

Viimeisen kymmenen vuoden aikana on tapahtunut suurta kehitystä kudosspesifisten steroidihormonien säätelyyn osallistuvien HSD17 β -entsyymien toimintojen ymmärtämisessä. Lisäksi uusia HSD17 β -entsyymejä on identifioitu ja useiden entsyymien kiderakenteet on pystytty selvittämään. Tämä uusi informaatio on mahdollistanut ja edesauttanut HSD17 β -isoformispesifisten inhibiittoreiden kehittämisen.²³

HSD17 β 1-entsyymin katalysoimassa reaktiossa muodostuvan estradiolin tiedetään olevan keskeisessä osassa estrogeeniriippuvaisten sairauksien, kuten rintasyövän ja endometrioosin kehityksessä. Estrogeeniriippuvaisten sairauksien nykyisten lääkehoitojen, kuten antiestrogeenien, käyttöä rajoittavat usein näiden aiheuttamat sivuvaikutukset. Paikallisten estrogeenibiosynteesien viimeisten vaiheiden inhiboinnin uskotaan olevan paremmin siedetty, mutta silti tehokas hoitomekanismi.^{24 4}

HSD17 β 1-entsyymin inhibiition tarkoituksena on estää entsyymiä katalysoimasta reaktiota, jossa estradiolia muodostuu. Käytettävien inhibiittoreiden täytyy olla hyvin selektiivisiä vain HSD17 β 1-entsyymille, sillä HSD17 β 2-entsyymi katalysoi vastakkaista estradioli \rightarrow estroni reaktiota, jonka inhiboiminen ei ole toivottua.⁴

5 MENETELMÄT

Menetelmäkehityksellä pyritään saamaan toimiva, toistettava ja luotettava menetelmä, jolla voidaan seuloa HSD17 β 1-entsyymien inhibiittoreita. Menetelmän periaatteena on inkuboida HSD17 β 1-entsyymiä + ^3H -leimattua substraattia + kofaktoria \pm inhibiittoria reaktiopuskurissa, jonka jälkeen lähtöaine ja lopputuote erotetaan korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Entsyymien katalysoiman reaktion lähtöaineiden ja tuotteiden konversiota mitataan Watersin HPLC-laitteella ja Packardin leimalaskindetektorilla. Jotta konversio havaitaan käytetyllä detektorilla, tulee lähtöaine olla leimattu sopivalla radioaktiivisella leimalla. Koska testeissä käytetyn proteiinin katalysoima reaktio on pelkistys estradioliksi, käytetään tritium-leimattua estronia leimattuna substraattina. Testeissä käytetty HSD17 β 1-proteiini on BiologicsCorp proteiini valmistajan tuottama. Proteiini on tuotettu *E.coli* -bakteerissa ja puhdistettu affiniteettikromatografialla proteiinin N-terminaaliin liitetyn peptidin avulla. Proteiinin sertifikaatti löytyy liitteestä 2. Työssä käytettyjen reagenssien tiedot löytyvät liitteestä 1.

Tämän kappaleen seuraavissa kohdissa on selvitetty käytettävä analyysilaitteisto ja ajo-olosuhteet, sekä entsyymille tehtävät erilaiset testit. Testeistä löytyvät sekä optimoitavat parametrit, että reaktioiden olosuhteet.

5.1 Analyysilaitteisto

Käytettävä analyysilaitteisto koostui Watersin 2790 separation module HPLC erotuslaitteistosta, jossa käytettiin Watersin Symmetry C18 esikolonnia (Part No. WAT054225) sekä Watersin Symmetry C18 kolonnia, 3,9 x 150 mm, 5 μM , (Part No. WAT054205) erotuskolonnia. Detektorina käytettiin Packard Flow Scintillation Analyzer 150TR leimalaskindetektoria.

Analyysilaitteiston ajo-olosuhteet pysyivät samanlaisina jokaisessa määrittäyksessä. Määrittäyksen ajoaika oli 8 min, injektiotilavuutena 50 μl . Ajoliuoksena käytettiin asetonitriliä ja MilliQ-vettä, 48/52 suhteessa. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 1 ml/min. Detektorilla käytettiin Ecoscint tuikeluosta, jonka virtaus oli 2,5 ml/min. Tuikeluos virtasi laitteistossa 1-7 minuutin ajan.

5.2 Entsyymien aktiivisuussmittauksen optimointi

Menetelmäkehityksessä optimoitavat parametrit olivat proteiinipitoisuus, substraattipitoisuus, kofaktoripitoisuus, inkubointilämpötila sekä reaktiopuskurin pH. Menetelmäkehitys aloitettiin proteiinipitoisuuden määrittämisellä. Määrittämiselle valittiin ensin laaja pitoisuusalue 0,01 – 10 µg/ml, sillä proteiinin aktiivisuudesta ei ollut minkäänlaista pohjatietoa. Käytetyt proteiinipitoisuudet olivat 0,01, 0,1, 1 ja 10 µg/ml. Reaktiot suoritettiin 96-kuoppalevyllä pipetoimalla levyille ensin eri määrät proteiinia. Tämän jälkeen levyille pipetoitiin 200 µl reaktioseosta, joka sisälsi 20 mM KH₂PO₄ + 1mM EDTA, pH 7,4 puskuriliuosta, 1 mM NADPH kofaktoria, 30 nM estronia sekä 5 nM tritium-leimattua estronia. Näytteistä tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä. Näytteet inkuboitiin 25 minuutin ajan huoneenlämmössä. Inkubointiajan päätyttyä reaktiot lopetettiin pipetoimalla kuoppiin 22 µl 10 % trikloorietikkahappo (TCA) -liuosta. Tämän jälkeen levyt sentrifugoitiin 4000 rpm, 8 min, + 16 °C, jonka jälkeen reaktiolevyltä siirrettiin 170 µl näytteitä HPLC-levylle analyysiä varten.

Seuraavassa testissä optimoitiin proteiinin pitoisuus käyttämällä pienempää pitoisuusaluetta, ja pitoisuuksia jotka olivat lähempänä toisiaan. Testattavat proteiinipitoisuudet olivat 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 ja 0,5 µg/ml. Tällä samalla testillä tutkittiin myös inkubointilämpötilan vaikutusta. Testi suoritettiin samalla tavalla kuin aikaisempikin proteiinitesti, mutta toinen reaktiolevy inkuboitiin huoneenlämmössä ja toinen lämpökaapissa +37 °C lämpötilassa. Molemmat reaktiolevyt valmistettiin täysin samanlaisesti käyttäen samaa reaktioseosta ja samoja proteiinilaimennoksia. Kaikista näytteistä tehtiin 4 rinnakkaista määrittystä.

Substraatti- ja kofaktoripitoisuuden optimaalisten arvojen tutkiminen suoritettiin yhdellä testillä. Substraattipitoisuuksina käytettiin 5, 25, 30, 50, 100, 200 ja 400 nM estronia. Kofaktoripitoisuuksia oli kolme; 0,1, 1 ja 5 mM NADPH. Leimatun substraatin pitoisuus oli sama kuin aikaisemmissa testeissä, 5 nM. Testi suoritettiin valmistamalla reaktioseoksia ensin kolme kappaletta, joihin kaikkiin lisättiin sama määrä tritium-leimattua substraattia. Tämän jälkeen reaktioseoksiin lisättiin jokaiseen eri määrät kofaktoria. Nämä kolme putkea jaettiin jokainen 7 eri putkeen, joihin lisättiin eri määrät substraattia. Näin saatiin 21 kpl reaktioseoksia, joissa jokaisessa oli eri substraatti- sekä kofaktoripitoisuudet. Käytettävä proteiini (0,15 µg/ml) lisättiin suoraan reaktioseokseen, jonka jälkeen reaktioseos pipetoitiin reaktiolevylle inkubointia varten. Inkubointi suoritettiin lämpökaapissa + 37 °C lämpötilassa 25 minuutin ajan. Reaktion lopetus, sentrifugointi ja

siirto ajolevylle suoritettiin aiemmin mainitulla tavalla. Jokaisesta reaktioseoksesta tehtiin 4 rinnakkaista määrittystä.

Puskuriliuoksen pH:n optimointi suoritettiin tekemällä ensin yksi 20 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA puskuriliuos, joka jaettiin kuuteen osaan. Jokaisen puskuriliuoksen pH säädettiin käyttäen joko 2 M kaliumhydroksidiliuosta tai 1 M suolahappoliuosta riippuen halutusta happamuudesta/emäksisyydestä. Käytettävien puskuriliuosten pH:t olivat 3,5, 5,5, 6,5, 7,4, 8,5, sekä 10,5. Näihin kuuteen eri puskuriliuokseen valmistettiin samanlaiset reaktioseokset, jotka sisälsivät proteiinia 0,15 µg/ml, 1 mM NADPH, 25 nM estronia sekä 5 nM tritium-leimattua substraattia. Näitä reaktioseoksia siirrettiin jokaista 200 µl reaktiolevylle. Jokaisesta tehtiin 4 rinnakkaista määrittystä. Inkubointi suoritettiin lämpökaapissa + 37 °C lämpötilassa 25 minuutin ajan. Reaktion lopetus, sentrifugointi ja siirto HPLC-levylle suoritettiin aikaisempien testien lailla.

5.3 Entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus

Edellisillä testeillä optimoitujen parametrien pohjalta kehitetty uusi menetelmä testattiin käyttäen kolmea testi-inhibiittoria, joista tehtiin IC_{50} -määrittys. Käytetyt testi-inhibiittorit olivat Forendo Pharman valmistamia. Testissä käytettiin 8 eri inhibiittoripitoisuutta, jotka olivat 10 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM ja 1 µM. Testiaineet laimennettiin käyttäen dimetyylisulfoksidia (DMSO), jonka lopullinen pitoisuus reaktioseoksessa oli 1 %. Laimennoksia pipetoitiin reaktiolevylle 2 µl: aa. Testiaineiden lisäksi kuoppiin pipetoitiin 200 µl reaktioseosta, joka sisälsi 0,35 µg/ml proteiinia, 1 mM NADPH, 25 nM estronia, 5 nM tritium-leimattua substraattia. Reaktioseoksessa käytettiin reaktiopuskuria 20 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA, jonka pH oli säädetty 6,6:een. Näytteistä valmistettiin 4 rinnakkaista määrittystä jokaisesta pitoisuudesta. Näytteet inkuboitiin 25 minuutin ajan huoneenlämmössä. Reaktion lopetus, sentrifugointi ja siirto HPLC-levylle suoritettiin aikaisempien testien lailla.

Suoritettu IC_{50} -määrittys toistettiin, jotta voitiin tarkkailla menetelmän toimivuutta. Testi suoritettiin proteiinipitoisuutta lukuun ottamatta täysin samankaltaisesti kuin ensimmäinen IC_{50} -määrittys. Toisessa testissä proteiinipitoisuutena käytettiin 0,15 µg/ml, sillä testissä haluttiin myös kokeilla vaikuttaako pienempi konversio inhibiittoreiden inhibointitehoon.

6 TULOKSET

Seuraavassa kappaleessa käsitellään opinnäytetyön kokeellisessa osassa esitettyjen menetelmän parametrien optimointitestien tulokset. Kappaleessa esitellään myös kehitetty uusi lääkeaineseulontamenetelmä, sekä menetelmällä testattujen inhibiittoreiden IC₅₀-tulokset.

6.1 Proteiinipitoisuus

Työssä määritettiin aluksi proteiinipitoisuus laajemmalla asteikolla, josta seuraavaan testiin valittiin tarkempi pitoisuusalue. Ensimmäisen määrittelyn tuloksista (taulukko 1) nähdään että proteiini on suhteellisen aktiivinen, sillä jo 0,1 µg/ml pitoisuus konvertoi 30 % lähtöaineesta tuotteiksi. Tämän testin perusteella seuraavan testiin proteiinipitoisuusalueeksi valittiin 0,05 – 0,5 µg/ml.

Taulukko 1. Entsyymien aktiivisuusmittauksen tulokset.

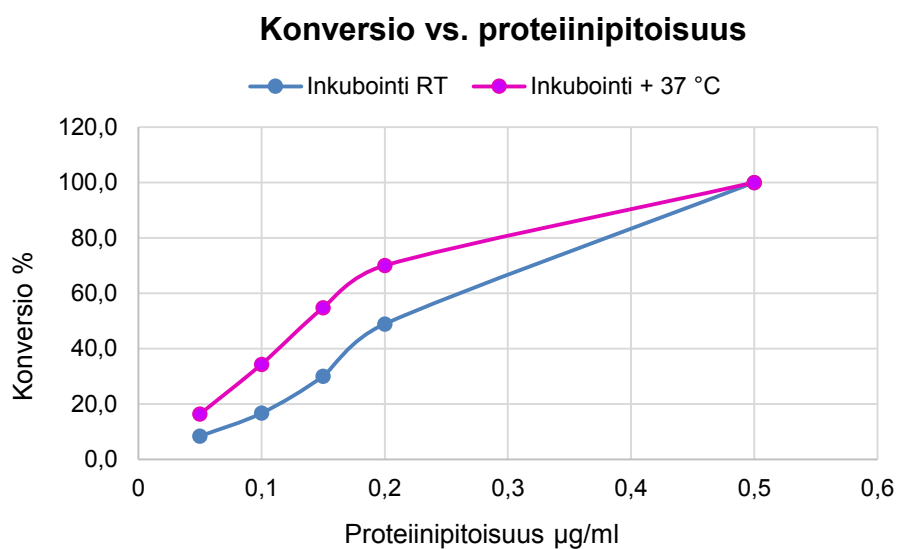
Näyte	Konversio %
HSD1 10 µg/ml	100,00
HSD1 1 µg/ml	100,00
HSD1 0,1 µg/ml	30,20
HSD1 0,01 µg/ml	2,18

Seuraavassa testissä tarkemman proteiinipitoisuuden lisäksi määritettiin myös inkubointilämpötilan vaikutus entsyymien aktiivisuuteen. Taulukkoon 2 on kirjattu tämän testin tulokset. Ensimmäiset tulokset ovat inkuboinnista huoneenlämmössä (RT), ja jälkimmäiset tulokset ovat inkuboinnista lämpökaapissa (+ 37 °C).

Taulukko 2. Proteiinipitoisuuden optimoinnin tulokset.

Näyte	Konversio %
HSD1 0,5 µg/ml RT	100,00
HSD1 0,2 µg/ml RT	48,90
HSD1 0,15 µg/ml RT	30,07
HSD1 0,1 µg/ml RT	16,71
HSD1 0,05 µg/ml RT	8,37
HSD1 0,5 µg/ml + 37 °C	100,00
HSD1 0,2 µg/ml + 37 °C	70,01
HSD1 0,15 µg/ml + 37 °C	54,74
HSD1 0,1 µg/ml + 37 °C	34,37
HSD1 0,05 µg/ml + 37 °C	16,37

Tuloksista voidaan todeta korkeamman inkubointilämpötilan tehostavan entsyymin aktiivisuutta. Tämän testin tulosten perusteella inkubointilämpötilaksi seuraaviin testeihin valittiin +37 °C. Proteiinipitoisuudeksi valittiin 0,15 µg/ml, eli pitoisuus jolla lähtöaineen konversio lopputuotteeksi on noin 30 – 60 %. Taulukon 2 tuloksista tehtiin kuvaaja (kuvio 7) jossa konversio on esitetty proteiinipitoisuuden funktiona.



Kuvio 7. Konversio vs. proteiinipitoisuus.

6.2 Substraatti- ja kofaktoripitoisuus

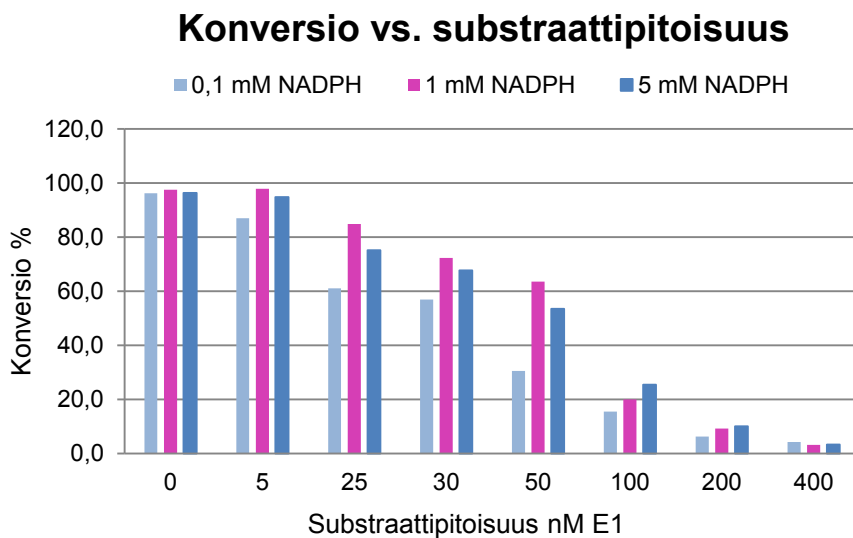
Substraatti- ja kofaktoripitoisuuden määrittämisessä substraattipitoisuuksia testattiin laajalta alueelta, 5 – 400 nM ja kofaktoripitoisuuksia suppeammin; 0,1, 1 ja 5 mM. Kofaktorina menetelmässä käytettiin NADPH:ta, koska HSD17 β 1-entsyymin toiminta on siitä riippuvaista. Taulukosta 3 löytyvät tämän testin tulokset.

Taulukko 3. Substraatti- ja kofaktoripitoisuuden optimoinnin tulokset.

Näyte	Konversio %
HSD1 0 nM E1/ 0.1 mM NADPH	96,17
HSD1 0 nM E1/ 1 mM NADPH	97,55
HSD1 0 nM E1/ 5 mM NADPH	96,37
HSD1 5 nM E1/ 0.1 mM NADPH	86,93
HSD1 5 nM E1/ 1 mM NADPH	97,88
HSD1 5 nM E1/ 5 mM NADPH	94,73
HSD1 25 nM E1/ 0.1 mM NADPH	61,10
HSD1 25 nM E1/ 1 mM NADPH	84,83
HSD1 25 nM E1/ 5 mM NADPH	75,15
HSD1 30 nM E1/ 0.1 mM NADPH	56,97
HSD1 30 nM E1/ 1 mM NADPH	72,33
HSD1 30 nM E1/ 5 mM NADPH	67,66
HSD1 50 nM E1/ 0.1 mM NADPH	30,56
HSD1 50 nM E1/ 1 mM NADPH	63,59
HSD1 50 nM E1/ 5 mM NADPH	53,54
HSD1 100 nM E1/ 0.1 mM NADPH	15,51
HSD1 100 nM E1/ 1 mM NADPH	20,05
HSD1 100 nM E1/ 5 mM NADPH	25,48
HSD1 200 nM E1/ 0.1 mM NADPH	6,22
HSD1 200 nM E1/ 1 mM NADPH	9,28
HSD1 200 nM E1/ 5 mM NADPH	10,10
HSD1 400 nM E1/ 0.1 mM NADPH	4,23
HSD1 400 nM E1/ 1 mM NADPH	3,20
HSD1 400 nM E1/ 5 mM NADPH	3,34

Tuloksista nähdään konversion olevan sitä korkeampi, mitä vähemmän substraattia reaktioseoksessa on. Tuloksista huomataan myös 1 mM NADPH -pitoisuuden antavan parhaimman entsyymiaktiivisuuden matalammilla substraattipitoisuuksilla. Substraattipitoisuudeksi seuraaviin testeihin valittiin 25 nM. Kofaktoripitoisuudeksi valittiin 1 mM NADPH. Tuloksista tehtiin myös pylväsdiagrammi (kuvio 8) havainnollistamaan tuloksia.

Kuvaajasta nähdään selkeästi kuinka substraattipitoisuuden kasvattaminen vähentää aktiivisuutta.



Kuvio 8. Konversio vs. substraattipitoisuus.

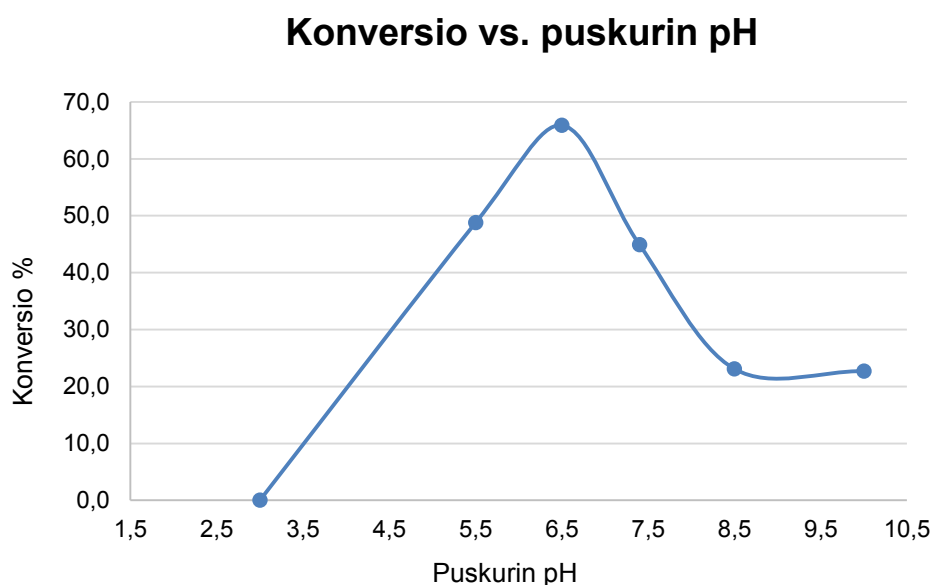
6.3 Puskuriliuoksen pH

Puskuriliuoksen sopivinta pH:ta testattiin kuudella puskurilla. Puskuriliuoksena käytettiin 20 mM KH_2PO_4 + 1mM EDTA -liuoksia, joiden pH:t olivat välillä pH 3 - 10. Tämän testin tulokset ovat taulukossa 4.

Taulukko 4. Puskuriliuoksen pH-arvon optimointi.

Näyte	Konversio %
HSD1 pH 3	0,00
HSD1 pH 5.5	48,77
HSD1 pH 6.5	65,89
HSD1 pH 7.4	44,89
HSD1 pH 8.5	23,09
HSD1 pH 10.0	22,70

Tuloksista havaitaan puskuriliuoksen, jonka pH on 6,5 olevan entsyymiaktiivisuuden kannalta sopivin puskuri. Taulukon tuloksista tehtiin kuvaaja, joka löytyy kuviosta 9. Tulokset muodostavat selkeän käyrän, josta entsyymin optimi pH on hyvin havaittavissa.



Kuvio 9. Konversio vs. puskuriliuoksen pH.

6.4 Uusi seulontamenetelmä

Optimointitestien pohjalta kehitetyssä uudessa seulontamenetelmässä käytetään leima-
 tun substraatin pitoisuutena 5 nM. Leimaamattoman substraatin pitoisuutena käytetään
 25 nM ja kofaktoripitoisuutena 1 mM. Puskurina käytetään 20 mM KH_2PO_4 + 1 mM
 EDTA, jonka pH on säädetty arvoon 6,6. Inkubointi suoritetaan huoneenlämmössä, 25
 minuutin ajan. Proteiinipitoisuudelle ei saatu optimoitua tarkkaa arvoa, sillä entsyymin
 pitoisuus hieman vaihtelee säilytysputkesta toiseen. Ennen varsinaista lääkeaineseulon-
 taa tehdään proteiinitesti, jolla sopivin proteiinipitoisuus määritetään.

6.5 Entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus

Uuden seulontamenetelmän sekä entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus suoritettiin
 kolmella testiaineella tehtävällä IC_{50} -määrittelyllä. Inhibiittoreiden pitoisuudet olivat vä-
 lillä 10 pM – 1 μM . Analyysin alussa sekä lopussa mitattiin DMSO-kontrollinäytteet, jotka
 tarvittiin inhibiointitehon laskemiseksi. Inhibiittoreiden inhibitioprosentti on laskettu kaa-
 valla 5.

$$\frac{(DMSO \text{ ctrl konversio } \% - \text{ inhibiittori konversio } \%) \cdot 100}{DMSO \text{ ctrl konversio } \%}$$

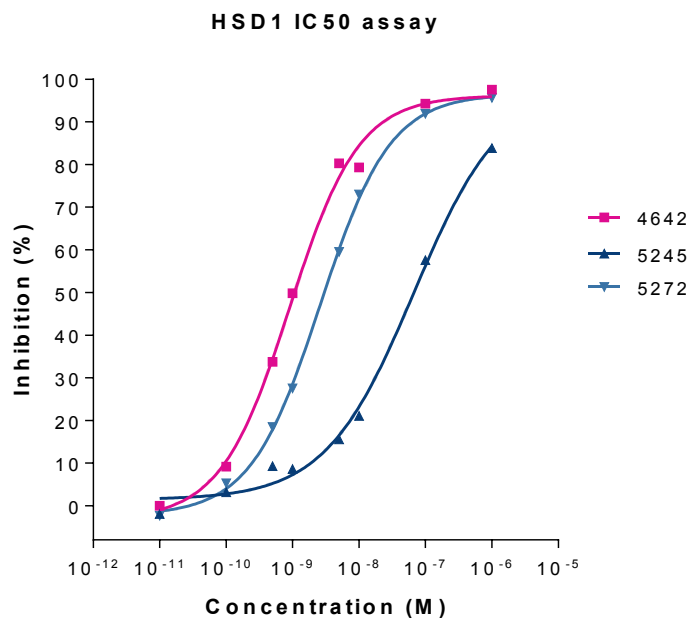
Kaava 5. Inhibitioprosentin laskeminen. ²⁵

IC₅₀-määrittäminen tehtiin kahteen kertaan, jotta voitiin tarkkailla kehitetyn menetelmän toimivuutta. Taulukosta 5 löytyvät molempien määrittäysten tulokset, missä ovat sekä analyysilaitteen antamat konversioprosentit että lasketut inhibitioprosentit.

Taulukko 5. Inhibiittoritestin tulokset

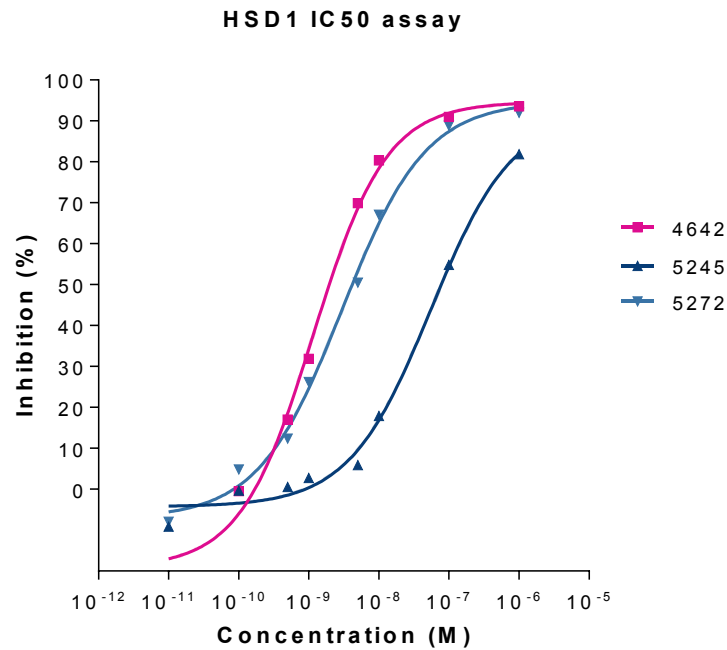
Näyte	Määrittäminen 1		Määrittäminen 2	
	Konversio %	Inhibiitio %	Konversio %	Inhibiitio %
DMSO ctrl	74,24		28,40	
ID 4642 1µM	1,83	97,53	1,83	93,55
ID 4642 100 nM	4,25	94,27	2,56	90,98
ID 4642 10 nM	15,38	79,29	5,59	80,34
ID 4642 5 nM	14,65	80,26	8,55	69,91
ID 4642 1 nM	37,27	49,80	19,35	31,87
ID 4642 500 pM	49,18	33,76	23,58	17,00
ID 4642 100 pM	67,45	9,15	28,53	-0,44
ID 4642 10 pM	74,22	0,03	34,15	-20,23
ID 5245 1 µM	11,98	83,87	5,16	81,83
ID 5245 100 nM	31,52	57,55	12,83	54,84
ID 5245 10 nM	58,59	21,08	23,33	17,88
ID 5245 5 nM	62,69	15,57	26,74	5,88
ID 5245 1 nM	67,84	8,63	27,63	2,72
ID 5245 500 pM	67,36	9,27	28,26	0,51
ID 5245 100 pM	71,87	3,20	28,50	-0,35
ID 5245 10 pM	75,67	-1,91	31,00	-9,12
ID 5272 1 µM	3,27	95,60	2,29	91,96
ID 5272 100 nM	6,03	91,88	3,18	88,82
ID 5272 10 nM	20,06	72,99	9,35	67,07
ID 5272 5 nM	30,06	59,51	14,08	50,45
ID 5272 1 nM	53,80	27,54	20,96	26,20
ID 5272 500 pM	60,53	18,47	24,90	12,34
ID 5272 100 pM	70,32	5,28	27,05	4,78
ID 5272 10 pM	75,97	-2,32	30,66	-7,95

Taulukon 5 ensimmäisistä tuloksista on tehty IC_{50} -kuvaaja (Kuvio 10). Kuvaajasta nähdään testiaineiden ID 4642 sekä ID 5272 tulosten olevan hyvin lähellä toisiaan.



Kuvio 10. Ensimmäisen IC_{50} -määrittelyn kuvaaja.

Taulukon 5 toisen määrittelyn tuloksista tehty kuvaaja on esitetty kuviossa 11. Kuvaajasta nähdään toisen määrittelyn tulosten korreloivan hyvin ensimmäisen määrittelyn tuloksia.



Kuvio 11. Toisen IC₅₀- määrittelyn tulosten kuvaaja

Kuvioista 10 ja 11 määritetyt testi-inhibiittoreiden IC₅₀-arvot löytyvät taulukosta 6. Taulukon tuloksista havaitaan molempien määrittelyjen antamien arvojen olevan suhteellisen lähellä toisiaan.

Taulukko 6. Testi-inhibiittoreiden IC₅₀ -arvot.

	Määrittys 1	Määrittys 2
Näyte	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
ID 4642	0,9	1,2
ID 5245	66,8	55,1
ID 5272	2,6	3,0

7 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää uusi seulontamenetelmä HSD17 β 1-entsyymien inhibiittoreille. Menetelmäkehityksessä tehtiin useita testejä, joilla entsyymiaktiivisuuden vaikuttavien parametrien optimaaliset arvot määritettiin. Näiden parametrien pohjalta kehitettiin uusi menetelmä, joka on esitetty kohdassa 6.4

Kokeellisesti määritetty inkubointilämpötilan vaikutus entsyymiaktiivisuuden noudatti kirjallisuudesta saatuja tietoja. Kirjallisuuslähteiden mukaan lämpötilan nousu johtaa usein kemiallisten reaktioiden aktiivisuuden nousuun.^{13 26} Suoritetussa testissä korkeampi inkubointilämpötila nosti entsyymien aktiivisuutta noin 10 - 20 prosenttiyksikköä. Korkeampaa inkubointilämpötilaa suunniteltiin käytettäväksi lopullisessa menetelmässä, mutta pohdinnan jälkeen todettiin sen kuitenkin aiheuttavan enemmän hankaluuksia työn suorituksessa siihen nähden, kuinka vähän se entsyymiaktiivisuutta nostaa. Näin uudessa menetelmässä päädyttiin inkuboimaan reaktio huoneenlämmössä.

Substraatti- ja kofaktoripitoisuuden määrittämisen tuloksista havaittiin matalamman substraattipitoisuuden toimivan parhaiten. Korkea substraattipitoisuus heikentää reaktiota todennäköisesti siksi, että entsyymi on jo täysin saturoitu testatuilla substraattipitoisuuksilla. Suurempi substraattipitoisuus vaatisi pidemmän reaktioajan kuin 25 minuuttia ja/tai suuremman määrän entsyymiä, jotta konversio olisi suurempi.

Puskuriliuoksen pH testin tuloksena saatu käyrä (Kuvio 9) on hyvin samankaltainen kuin kirjallisuuslähteissä esitetyt kuvaajat (²⁶ Figure 14, ¹³ Fig 1.8, ¹¹ Fig 9.5). Tämän entsyymien optimi pH on 6,5, vaikka entsyymi kuitenkin toimii suhteellisen hyvin myös optimi pH:n läheisyydessä olevissa pH-arvoissa (pH 5,5 – 7,5). Hyvin happaman liuoksen huomataan kuitenkin estävän entsyymien toiminta täysin.

Kahden suoritetun IC₅₀-määrittämisen tuloksia vertaamalla voidaan todeta menetelmän toimivan. Tulokset ovat hyvin vertailukelpoisia ja korreloivat keskenään. Testeissä käytetty inhibiittori ID 4642 on esitetty myös julkaisussa, jossa sen IC₅₀-arvoksi määritettiin 4 nM.²⁷ (Figure 1. Compound 21, Table 1.) Tätä tulosta verrattaessa saatuihin 0,9 nM ja 1,2 nM voidaan todeta menetelmän antavan samankaltaisia tuloksia.

Muutamiin julkaisuihin verraten kehitetty menetelmä on jonkin verran erilainen. Tässä opinnäytetyössä kehitetyssä menetelmässä substraattipitoisuus oli 25 nM estroni + 5 nM tritium-leimattu estroni, reaktiopuskuri 20 mM kaliumfosfaatti + 1 mM EDTA, minkä pH oli 6,6. Kofaktorina käytettiin 1 mM NADPH. Opinnäytetyössä kehitetty ja julkaisuissa esiintyneet menetelmät eroavat toisistaan useamman parametrin suhteen. Yhdistävänä tekijänä menetelmien parametreissa oli ainoastaan puskurin pH, joka oli kaikissa joko 6,6 tai 6,5. Julkaisuissa esitetyissä menetelmissä käytettyjen fosfaattipuskuriliuosten vahvuus taas vaihteli 50 mM – 100 mM + 1mM EDTA. Kofaktorina julkaisujen menetelmissä käytettiin joko 100 µM tai 500 µM NADPH:ta. Substraatin pitoisuus oli yhdessä esitetyssä menetelmässä 15 nM ja toisessa 500 nM. Kaikissa julkaisuissa esitetyissä menetelmissä inkubointi suoritettiin + 37 °C lämpötilassa.^{28 29 30} Menetelmissä esiintyneet parametrit vaihtelevat paljon luultavasti käytettävän entsyymin erilaisuuden vuoksi. Entsyymien tuotanto- ja puhdistustapa vaikuttavat entsyymin aktiivisuuteen.

Ennen uuden kehitetyn menetelmän lopullista käyttöönottoa täytyy menetelmällä tehdä vielä useampia toistettavuustestejä. Myös menetelmän oikeellisuus tulee testata analysoimalla useampia testiaineita ja vertailemalla uudella menetelmällä saatuja tuloksia aikaisemmalla menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tämän opinnäytetyön puitteisiin nämä testit eivät enää ajallisesti mahtuneet, mutta ne tullaan suorittamaan myöhemmin Forendo Pharmassa.

LÄHTEET

- ¹ Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, viitattu 20.4.2016 <https://www.thl.fi/fi/web/kansantaudit/syopa/syovan-yleisyys>
- ² Syöpäinfo, viitattu 20.4.2016. <http://www.syopainfo.fi/syovan-hoito/laakehoito.html>
- ³ Endometrioosiyhdistys, viitattu 20.4.2016. <http://www.endometrioosiyhdistys.fi/fi/tietoaendometrioosista>
- ⁴ Marchais-Oberwinkler *et al.*, (2012). 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development
- ⁵ Frank, E. ja Schneider, G. (2012) Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity
- ⁶ Bellem *et al.* (2011). Measuring Estrogens and Progestagens in Humans: An Overview of Methods
- ⁷ Healthy women, viitattu 20.4.2016. <http://www.healthywomen.org/condition/estrogen>
- ⁸ Norman, A.W. ja Litwack, G. (2014). Hormones (3rd Edition)
- ⁹ Mindnich *et al.* (2004). The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases
- ¹⁰ Jeon *et al.* (2016) Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development
- ¹¹ Dwivedi, N. ja Dwivedi, S.P.,(2009). Comprehensive Biochemistry
- ¹² Copeland, R. A., (2013). Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists (2nd Edition)
- ¹³ Indira *et al.*, (2010). College biochemistry:VI
- ¹⁴ Bhagavan, N. V., (2001). Medicinal Biochemistry (4th Edition)
- ¹⁵ Wikibooks, Biochemistry, Enzymes viitattu 28.1.2016. <https://en.wikibooks.org/wiki/Biochemistry/Enzymes>
- ¹⁶ Powar, C.B. ja Chatral, G.R., (2008). Biochemistry
- ¹⁷ Pharmafactz, Medicinal Chemistry – Understanding Enzyme Kinetics, viitattu 26.1.2016. <http://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-understanding-enzyme-kinetics/>
- ¹⁸ The Rise of The Biochemians, viitattu 5.2.2016. <https://daniellaharewood.wordpress.com/2013/04/14/227/>
- ¹⁹ Pharmacelsus, Contract research organisation, viitattu 5.4.2016. <http://www.pharmacelsus.de/ic50/>
- ²⁰ Byrns *et al.*, (2010). Inhibitors of type 5 17-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights
- ²¹ Lukacik *et al.*(2006) Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases

-
- ²² Järvensivu *et al.* (2015). HSD17B1 expression enhances estrogen signaling stimulated by the low active estrone, evidenced by an estrogen responsive element-driven reporter gene in vivo
- ²³ Trevor M. Penning, (2011). Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: Insights into inhibitor design and evaluation
- ²⁴ Taija Saloniemi, Turun Yliopisto, (2009). Role of human hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase type 1 (HSD17 β 1) in steroid-dependent diseases in females – Novel indications for HSD17 β 1 inhibitors
- ²⁵ Forendo Pharma, Working Instruction WI/01-1
- ²⁶ Worthington Biochemical Corporation, Factors Affecting Enzyme Activity, viitattu 5.4.2016. <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/Enzymes.pdf>
- ²⁷ Messinger *et al.* (2008). Estrone C15 derivatives –A new class of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
- ²⁸ Deluca *et al.* (2006). Inhibitory effects of fluorine-substituted estrogens on the activity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases
- ²⁹ Oster *et al.* (2010). Novel estrone mimetics with high 17 β -HSD1 inhibitory activity
- ³⁰ Starcevic *et al.* (2011). Biochemical and biological evaluation of novel potent coumarin inhibitor of 17 β -HSD type 1

KÄYTETTYJEN REAGENSSEIEN TIEDOT

Kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4 , Merck, Lot: A0104673 945

EDTA, Sigma, Lot: 99H0095

^3H -Estroni, Estrone, $[2,4,6,7\text{-}^3\text{H}(\text{N})]$, Perkin Elmer, Lot: 2044288

Estroni, Sigma, Lot: 091M1732V

NADPH, Sigma, Lot: SLBM0996V

TCA, Sigma, Lot: 120M6085

Asetonitrili, VWR, HiPerSolv CHROMANORM, Lot: 15I111100

Metanoli, J.T.Baker, HPLC Gradient grade, Lot: 1107712003

Suolahappo, HCl, Merck, 37 %, Lot: K41356117033

Kaliumhydroksidi, KOH, Sigma, Lot: SZBC2010V

DMSO, Sigma, Lot: SZBD003AV

Ecoscint A, National diagnostics, Lot: 081528

HSD17 β 1-proteiinin sertifikaatti

Certificate of Analysis

Hs-HSD17B1 (human) Protein

Lot: P2201773

Name:

Hs-HSD17B1 protein (expressed in *E. coli*)

Purification:

Hs-HSD17B1 protein was obtained from supernatant followed by purification steps.

Final Prep:

N-His₆ tagged protein: 3.27 mg total (1.09 mg/vial x 3 vials)

Protein Concentration:

0.607 mg/ml, as determined by Bradford protein assay with BSA as a standard

Purity:

>90% as judged by SDS-PAGE analysis

Formulation:

In 1 x PBS (pH7.4) and 20% glycerol.

Storage and Handling:

For long term use, aliquot and store at -80°C (avoiding frequent freeze-thaws).

Quality Assurance:

